

**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**KINETIČKE ZNAČAJKE  $\alpha$ -TERPINOLENA KAO  
INHIBITORA BUTIRILKOLINESTERAZE**

**ZAVRŠNI RAD**

**KRISTINA STRUNJE**

**Matični broj: 265**

**Split, Listopad 2016**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU  
KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**KINETIČKE ZNAČAJKE  $\alpha$ -TERPINOLENA KAO  
INHIBITORA BUTIRILKOLINESTERAZE**

**ZAVRŠNI RAD**

**KRISTINA STRUNJE**

**Matični broj: 265**

**Split, Listopad 2016**

**UNIVERSITY OF SPLIT  
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY  
UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**KINETIC FEATURES OF BUTYRYLCHOLINESTERASE  
INHIBITOR  $\alpha$ -TERPINOLENE**

**BACHELOR THESIS**

**KRISTINA STRUNJE**

**Parent number: 265**

**Split, October 2016.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

### ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско-tehnološkog fakulteta

**Mentor:** dr. sc. Franko Burčul, znanstveni suradnik

**Pomoć pri izradi:**

### KINETIČKE ZNAČAJKE $\alpha$ -TERPINOLENA KAO INHIBITORA BUTIRILKOLINESTERAZE

Kristina Strunje, 265

**Sažetak:** Enzimi su katalizatori u biološkim sustavima. Ubrzavaju reakcije snižavanjem energije aktivacije. Gotovo svi poznati enzimi su proteini. Najvažniji dio enzima je aktivno mjesto u kojem se odvija specifična reakcija. Butirilkolinesteraza (BuChE) pripada skupini kolinesteraza odnosno estereaza. Esteraze spadaju u grupu hidrolaza. BuChE inaktivira neurotransmitter acetilkolin (ACh) i kao takva je postala terapijski cilj u podmaklim fazama Alzheimerove bolesti. Kao izvor enzima korištena je butirilkolinesteraza (BuChE) iz seruma konja, a kao supstrat enzima korišten je butiriltiokolin jodid (BuTChI). Kao inhibitor enzima korišten je  $\alpha$ -terpinolen. Iz Lineweaver-Burk, Hanes-Wolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza te izračunatih postotaka inhibicije zaključeno je da  $\alpha$ -terpinolen pokazuje sposobnost inhibicije enzima BuChE. Kako se povećava koncentracija  $\alpha$ -terpinolena povećava se i postotak inhibicije. Također je zaključeno da se radi o inhibiciji miješanog tipa te su određeni odgovarajući kinetički parametri  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ,  $K_I$  i  $K_I'$ .

**Ključne riječi:** butirilkolinesteraza, inhibicija  $\alpha$ -terpinolena, kinetika, Alzheimerova demencija.

**Rad sadrži:** 38 stranice, 29 slika, 7 tablica, 0 priloga, 23 literaturnih navoda.

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Mila Radan - predsjednik
2. Dr. sc. Mario Nikola Mužek, znan. sur. - član
3. Dr. sc. Franko Burčul, znan. sur. - član - mentor

**Datum obrane:** 27.10.2016.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Rudera Boškovića 35.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

### BACHELOR THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Undergraduate study of chemistry

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 4.

**Mentor:** dr. sc. Franko Burčul, research associate

**Technical assistance:**

### KINETIC FEATURES OF BUTYRYLCHOLINESTERASE INHIBITOR- $\alpha$ -TERPINENE

Kristina Strunje 265

**Abstract:** Enzymes are catalysts in biological systems. Accelerate reactions by lowering the activation energy. Nearly all known enzymes are proteins. The most important part of the enzyme is their active site where reactions take place. Butyrylcholinesterase (BuChE) belongs to a class of cholinesterase or esterase. Esterases belong to the group of hydrolases. BuChE inactivates the neurotransmitter acetylcholine (ACh) and as such has become a therapeutic target in later stages of Alzheimer's disease. Butyrylcholinesterase (BuChE) enzyme was obtained from the horse serum, and as a substrate of the enzyme was used butyrylthiocholine iodide (BuTChI). The enzyme used was  $\alpha$ -terpinolene. From Lineweaver-Burk, Hanes-Wolf and Eisenthal - Cornish-Bowden display and calculated the percent inhibition was concluded that  $\alpha$ -terpinolene shows the ability to inhibit the enzyme BuChE.  $\alpha$ -Terpinolene inhibits BuChE in dose dependent manner. It was also concluded that it is a mixed type inhibition and certain corresponding kinetic parameters  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ,  $K_I$  and  $K_I'$ .

**Keywords:** butyrylcholinesterase, inhibition,  $\alpha$ -terpinolene, kinetics, Alzheimer's dementia

**Thesis contains:** 38 pages, 29 pictures, 7 tables, 0 contributions, 23 literary references.

**Original in:** Croatian.

**Defence committee:**

1. Mila Radan, PhD, assistant prof. - chair person
2. Mario Nikola Mužek, PhD - member
3. Franko Burčul, PhD - supervisor

**Defence date:** October 27<sup>th</sup>, 2016.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Rudera Boškovića 35.

*Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu  
pod mentorstvom znanstvenog suradnika dr. sc. Franka Burčula, u vremenskom  
razdoblju od svibnja do listopada 2016. godine.*

Rad je financiran od Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-6897.

*Iskreno se zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Franku Burčulu koji mi je pomogao svojim znanstvenim i stručnim savjetima pri izradi ovog završnog rada, i također mu hvala na savjetima i pomoći tijekom studiranja.*

*Posebna zahvala mojim roditeljima, obitelji, dečku i prijateljima na razumijevanju i podršci tijekom studiranja.*

*Kristina Strunje*



## **ZADATAK ZAVRŠNOG RADA :**

- Ispitivanje inhibicijskih svojstava  $\alpha$ -terpinolena na enzim butirilkolinesterazu metodom po Ellmanu (postotak inhibicije, vrsta inhibicije);
- Određivanje kinetičkih parametara  $K_M$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}$ ,  $V_{max}^{app}$ ,  $K_I$  i  $K'_I$  enzima butirilkolisteraze u prisustvu  $\alpha$ -terpinolena kao inhibitora.

## Sažetak

Enzimi su katalizatori u biološkim sustavima. Ubrzavaju reakcije sniženjem energije aktivacije. Gotovo svi poznati enzimi su proteini. Najvažniji dio enzima je aktivno mjesto u kojem se odvija specifična reakcija. Butirilkolinesteraza (BuChE) pripada skupini kolinesteraza odnosno estereaza. Esteraze spadaju u grupu hidrolaza. BuChE inaktivira neurotransmiter acetilkolin (ACh) i kao takva postala je terapijski cilj u poodmaklim fazama Alzheimerove bolesti

Kao izvor enzima korištena je butirilkolinesteraza (BuChE) iz seruma konja, a kao supstrat enzima korišten je butiriltiokolin jodid (BuTChI). Kao inhibitor enzima korišten je  $\alpha$ -terpinolen. Iz Lineweaver-Burk, Hanes-Wolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza te izračunatih postotaka inhibicije zaključeno je da  $\alpha$ -terpinolen pokazuje sposobnost inhibicije enzima BuChE.

Kako se povećava koncentracija  $\alpha$ -terpinolena povećava se i postotak inhibicije. Također je zaključeno da se radi o inhibiciji miješanog tipa te su određeni odgovarajući kinetički parametri  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ,  $K_I$  i  $K_I'$ .

**Ključne riječi:** butirilkolinesteraza, inhibicija  $\alpha$ -terpinolena, kinetika, Alzheimerova demencija.

## Summary

Enzymes are catalysts in biological systems. Accelerate reactions by lowering the activation energy. Nearly all known enzymes are proteins. The most important part of the enzyme is their active site where reactions take place. Butyrylcholinesterase (BuChE) belongs to a class of cholinesterase or esterase. Esterases belong to the group of hydrolases. BuChE inactivates the neurotransmitter acetylcholine (ACh) and as such has become a therapeutic target in later stages of Alzheimer's disease.

Butyrylcholinesterase (BuChE) enzyme was obtained from the horse serum, and as a substrate of the enzyme was used butyrylthiocholine iodide (BuTChI). The enzyme used was  $\alpha$ -terpinolene. From Lineweaver-Burk, Hanes-Wolf and Eisenthal - Cornish-Bowden display and calculated the percent inhibition was concluded that  $\alpha$ -terpinolene shows the ability to inhibit the enzyme BuChE.

$\alpha$ -Terpinolene inhibits BuChE in dose dependent manner. It was also concluded that it is a mixed type inhibition and certain corresponding kinetic parameters  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ,  $K_I$  and  $K_I'$ .

**Keywords:** butyrylcholinesterase, inhibition,  $\alpha$ -terpinolene, kinetics, Alzheimer's dementia

## SADRŽAJ

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1. Enzimi .....	2
1.1.1. Struktura enzima .....	3
1.1.2. Nomenklatura i podjela enzima.....	4
1.2. Enzimska aktivnost .....	5
1.3. Enzimska kinetika .....	7
1.3.1. Michaelis-Menten model enzimski kataliziranih reakcija.....	7
1.4. Inhibicija enzimske aktivnosti.....	13
1.5. Butirilkolinesteraza .....	17
1.5.1. Fiziološka i farmakološka uloga .....	18
1.5.2. Butirilkolinesteraza i patološka stanja.....	18
1.5.3. Alzheimerova bolest.....	19
1.7. Spektrofotometrija.....	24
1.7.1. Ellmanova metoda.....	25
2. <b>EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	26
2.1. Priprema kemikalija .....	26
2.1.1. Određivanje kinetičkih parametara i sposobnosti inhibicije BuChE.....	27
3. REZULTATI.....	28
4. RASPRAVA .....	35
5. ZAKLJUČAK .....	36
6. LITERATURA.....	37

# UVOD

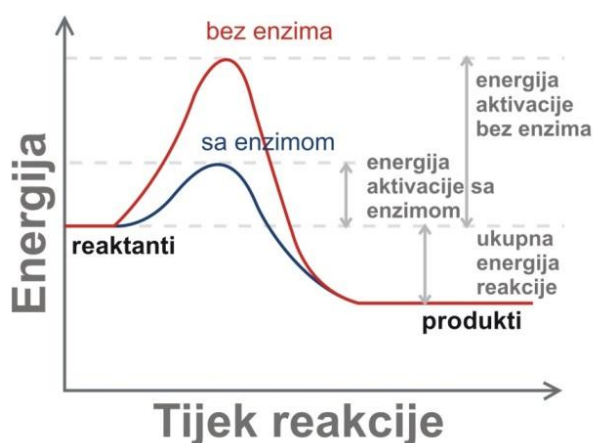
Enzimi su velike biološke molekule koje kataliziraju (ubrzavaju) različite reakcije u organizmu. Po reakcijama koje kataliziraju enzimi se svrstavaju u šest skupina: oksidoreduktaze (reakcije oksidacije i redukcije), transferaze (prijenos skupina atoma), hidrolaze (reakcije hidrolize), liaze (eliminacija skupina atoma uz nastanak dvostruke veze), izomeraze (reakcije izomerizacije) i ligaze (reakcije stvaranja kovalentne veze uz istodobnu hidrolizu adenozin-trifosfata). Gotovo svi do sada poznati enzimi su po kemijskom sastavu proteini, s tim da je svaki pojedini enzim odgovoran za specifičan supstrat i djeluje na specifične reakcije. Enzimi sadrže aktivno središte koje je dio njihove strukture i ima točno definiran oblik. Denaturiranjem enzimi gube svoju funkciju, iako definirani niz aminokiselina ostaje nepromijenjen. Mnogi se enzimi sastoje od proteinskog i neproteinskog (prostetskog) dijela. Da bi djelovao, enzim mora doći u fizički kontakt sa svojim supstratom. Nekada se smatralo da molekula supstrata pristaje u aktivno mjesto molekule enzima kao što ključ pristaje u bravu, tj. da su enzim i supstrat međusobno komplementarni. Međutim, pokazano je da je enzim komplementaran prijelaznomu stanju, tj. onomu kemijskom obliku koji supstrat mora poprimiti pri prelasku u produkt reakcije pa je upravo to razlogom ubrzanja reakcije. Kinetički parametri  $K_M$  i  $V_{max}$  su važne karakteristike enzima.  $K_M$  je koncentracija supstrata pri kojoj je popunjena polovica aktivnih mjesta i mjera je čvrstoće kompleksa enzim-supstrat (kada je  $k_{-1} \gg k_2$ ) dok  $V_{max}$  označava najveću teoretski moguću brzinu rada enzima (kada je  $[S] \gg [E]$ ).

Butirilkolinesteraza (BuChE) je enzim koji pripada skupini kolinesteraza odnosno esteraza. Esteraze su enzimi koji kataliziraju hidrolizu esterske veze, npr. lipida (lipaze, fosfolipaze), nukleinskih kiselina (nukleaze) i mnogih drugih međuprodukata metabolizma. BuChE može hidrolizirati acetilkolin i nadoknaditi acetilkolinesterazu (AChE) kada su njene razine iscrpljene. Kod Alzheimerove bolesti, u mozgu se smanjuje razina AChE, dok se razina BuChE povećava ili ostaje nepromijenjena. Kako bolest napreduje očituju se promjene u razinama BuChE. Inhibitori su molekule koje ili umanjuju aktivnost enzima ili potpuno deaktiviraju enzim; kao inhibitor butirilkolinesteraze u ovom radu korišten je  $\alpha$ -terpinolen.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. Enzimi

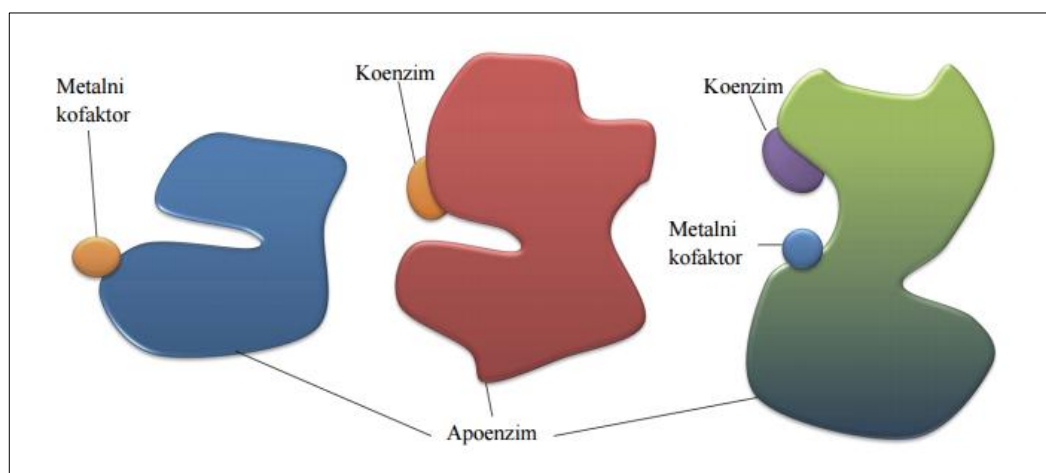
Enzimi su katalizatori u biološkim sustavima. Oni imaju veliku katalitičku moć. Mogu povećati brzinu reakcije za faktore od  $10^6$  puta i više. Ubrzavaju reakcije snižavanjem energije aktivacije. Enzimi usmjeruju kemijske pretvorbe, a također i posreduju u pretvaranju jednog oblika energije u drugi. Kataliziraju reakcije na taj način tako da stabiliziraju prijelazno stanje. U prisutnosti enzima mnogo se brže doseže ista točka ravnoteže. Gotovo svi enzimi koji su poznati su proteini. Oni su učinkoviti katalizatori jer imaju sposobnost specifičnog vezanja raznovrsnih molekula. Ta specifičnost enzima proizlazi iz precizne interakcije supstrata s enzimom. Za tu preciznost je zaslužna trodimenzionalna struktura enzimskog proteina.<sup>1</sup>



**Slika 1.** Reakcijski tijek nekatalizirane i katalizirane reakcije

### 1.1.1. Struktura enzima

Enzimi se mogu klasificirati u dvije grupe: jednostavni i konjugirani. Jednostavni su enzimi sastavljeni samo od proteina dok su konjugirani enzimi sastavljeni od proteinskog i neproteinskog dijela. Konjugirani enzimi nazvani holoenzimi su kombinacija proteinskog dijela apoenzima i jednog ili više kofaktora. Kofaktori mogu biti organske molekule, koenzimi, ili anorganske komponente (metalni ioni).<sup>2</sup>



**Slika 2.** Strukture konjugiranih enzima<sup>2</sup>

Apoenzimi imaju složenu strukturu koja se sastoji se primarne, sekundarne i tercijarne i/ili kvarterne strukture. Primarna, sekundarna i tercijarna struktura je proizašla iz polipeptidnog lanca koji je prošao procese savijanja i učvršćivanja prilikom sinteze formirajući tako vodikove i disulfidne veze. Polipeptidni lanac se slaže u energetski stabilniju strukturu stvarajući trodimenzionalno tijelo apoenzima. Koenzimi, organske komponente, djeluju zajedno s apoenzimom kako bi napravile potrebne promjene supstrata. Funkcija koenzima je da jednoj molekuli supstrata oduzima funkcionalne grupe i dodaje drugoj, odnosno kao transportni sustav određene funkcionalne grupe. Koenzimi su često vitamini ili potječu od vitamina.<sup>2</sup>

### **1.1.2. Nomenklatura i podjela enzima**

Prihvaćeni sustavi za sistematizaciju i nomenklaturu enzima obuhvaćaju tri osnovna principa:<sup>2</sup>

- imena enzima, pogotovo onih koji završavaju na –aza se daju samo pojedinačnim enzimima, odnosno ne bi se trebali davati sustavima koji sadrže više od jednog enzima;
- enzim se naziva i klasificira po reakciji koju katalizira. Reakcija mora biti u potpunosti istražena, a mehanizam dobro opisan. Intermedijerni koenzimi i različite grupe koje sudjeluju u mehanizmu se ne dodaju u naziv enzima;
- enzim se klasificira po tipu katalizirane reakcije i numerira se četveroznamenkastim kodom radi neupitne identifikacije.



**Tablica 1.** Enzimi su podijeljeni u šest klasa<sup>2</sup>

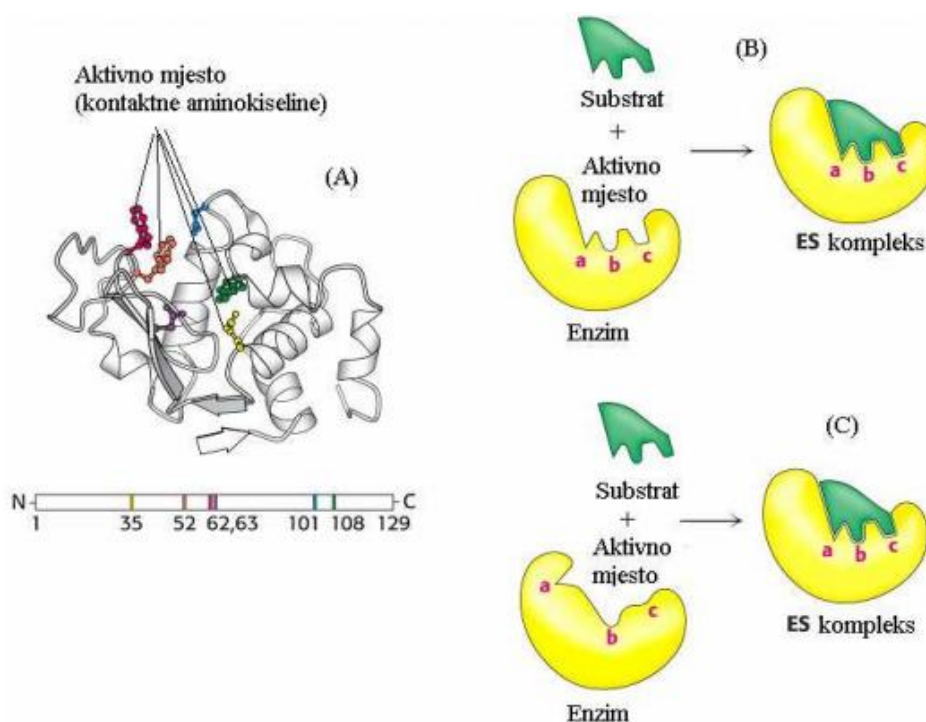
KLASA	IME	VRSTA KATALIZIRANE REAKCIJE	PRIMJER
1.	Oksidoreduktaze	Oksidacija-redukcija	dehidrogenaze, reduktaze, oksidaze, peroksidaze, katalaze
2.	Transferaze	Prijenos kemijskih grupa	kinaze, fosfomutaze
3.	Hidrolaze	Hidrolitičko cijepanje veza	fosfataze, tiolaze, fosfolipaze, deaminaze, ribonukleaze, esteraze
4.	Liaze	Nehidrolitičko cijepanje ostavljajući dvostruke veze, alternativno: adicija grupa na dvostruke veze	dekarboksilaze, aldolaze, hidrataze, dehidrataze, sintetaze, liaze
5.	Izomeraze	Promjena geometrijskog rasporeda u molekuli	izomeraze, mutaze (ne sve)
6.	Ligaze	Spajanje dviju molekula nakon čega slijedi hidroliza molekule koja ima veliki $\Delta G$	sintetaze, karboksilaze

## 1.2. Enzimska aktivnost

Pojam enzimska aktivnost podrazumijeva osobinu enzima da određenom brzinom katalizira transformaciju supstrata u produkt. Aktivnost enzima označava količinu supstrata koja se pod utjecajem enzima u jedinici vremena transformira u produkt reakcije. Aktivnost enzima ovisi o mnogo čimbenika od kojih su najvažniji pH, temperatura, koncentracija enzima, koncentracija supstrata, koenzimi, aktivatori, inhibitori, hormoni i druge biološki aktivne tvari.<sup>3</sup>

Dio enzima koji je odgovoran za njegovo djelovanje je aktivni centar (aktivno mjesto). Aktivno mjesto je definirano relativno malim brojem aminokiselina smještenih

u unutrašnjosti u hidrofobnom dijelu proteinske molekule, čije prostorno uređenje odgovara molekuli supstrata, te je kao takvo odgovorno za njegovu katalitičku moć. Aminokiseline koje izgrađuju aktivno mjesto ne moraju biti susjedne aminokiseline u peptidnom lancu (slika broj A). Supstrat (tvar na koju enzim djeluje) ulazi u aktivni centar i vezuje se za njega pri čemu nastaje kompleks enzim–supstrat (po principu ključ-brava). Kod nekih enzima aktivno mjesto može imati definirano prostorno uređenje prije i poslije vezanja supstrata (slika broj B), ali može i mijenjati prostorno uređenje u trenutku povezivanja sa supstratom (slika broj C).<sup>4</sup>



**Slika 3.** Aktivno mjesto enzima: aminokiseline koje sudjeluju u aktivnom mjestu (A), strogo definirano aktivno mjesto (B), aktivno mjesto koje mijenja svoju strukturu potaknuto vezivanjem supstrata (C).<sup>4</sup>

### 1.3. Enzimski kinetika

Proučavanje brzina kemijskih reakcija naziva se kinetikom, a proučavanje enzimskih reakcije kemijskom kinetikom. Najjednostavniji način na koji se može odrediti brzina reakcije jest mjerenje koncentracije produkta u ovisnosti o vremenu. Brzina  $V$  je količina  $A$  koja nestane u određenoj jedinici vremena.

Ona je jednaka brzini nastanka  $P$ :<sup>1</sup>

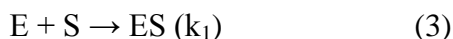


Karakteristike enzimski katalizirane reakcije:<sup>5</sup>

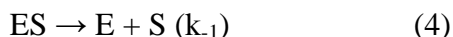
- brzina enzimski katalizirane reakcije obično je veća od brzine te iste reakcije katalizirane ne-biološkim katalizatorom
- enzimi su visokospecifični te uglavnom jedan enzim katalizira samo jednu reakciju pod određenim fizikalno-kemijskim uvjetima
- u organizmu postoji mnoštvo enzima od kojih svaki pojedini katalizira određenu reakciju koje su međusobno povezane unutar metabolizma

#### 1.3.1. Michaelis-Menten model enzimski kataliziranih reakcija

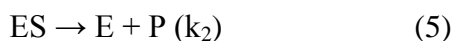
Michaelis i Menten su početkom 20. stoljeća analizirali kinetiku enzimске reakcije na temelju jednostavne pretpostavke da supstrat ( $S$ ) može biti preveden u produkt ( $P$ ) samo ako dođe u funkcionalni dodir s enzimom ( $E$ ), stvarajući kompleks enzim-supstrat ( $ES$ ):<sup>5</sup>



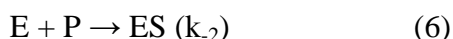
$k_1$ -konstanta nastajanja kompleksa



$k_{-1}$ -konstanta disocijacije kompleksa



$k_2$ -konstanta nastajanja produkta



$k_{-2}$ -konstanta disocijacije produkta

Kompleks ES koji je nastao povezivanjem enzima E sa supstratom S ima dvije moguće sudbine. On se može disocirati na E i S uz konstantu brzine  $k_{-1}$ , ili može prijeći u produkt P uz konstantu brzine  $k_2$ . Kompleks ES može ponovo nastati iz E i P uz konstantu brzine  $k_{-2}$ . Može se promatrati samo brzina reakcije na početku ( $v_0$ ) kada je koncentracija produkta zanemariva i nema povratne reakcije ( $k_{-2}[P] \approx 0$ ).<sup>1</sup>

$$v_0 = k_2[ES] \quad (7)$$

[ES] se može izraziti pomoću poznatih veličina. Brzine kojima ES nastaje i razgrađuje se su:<sup>1</sup>

$$\text{Brzina nastanka kompleksa ES} = k_1[E][S] \quad (8)$$

$$\text{Brzina razgradnje kompleksa ES} = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (9)$$

Maksimalna brzina reakcije,  $V_{\max}$ , postiže se kad su sva katalitička mjesta na enzimu zasićena supstratom, to jest kada je  $[ES] = [E]_T$ .<sup>1</sup>

$$V_{\max} = k_2[E]_T \quad (10)$$

Michaelis-Menten jednadžba glasi:<sup>1</sup>

$$v_0 = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (11)$$

$K_M$  je Michaelisova konstanta. Ona je jednaka koncentraciji supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne.  $K_M$  ima dimenziju koncentracije i nije ovisna o koncentracijama enzima i supstrata.<sup>1</sup>

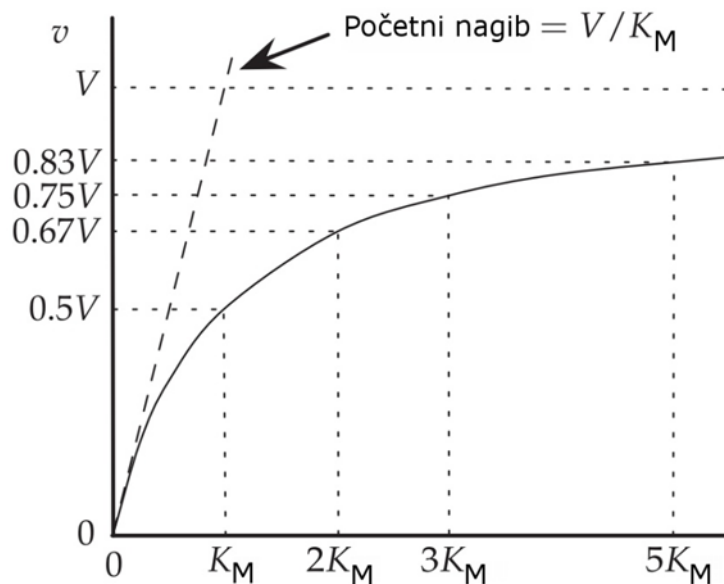
Pri malim koncentracijama supstrata, kada su one puno manje od  $K_M$ , izraz za  $V_0$  imati će sljedeći oblik:<sup>1</sup>

$$V_0 = \left( \frac{v_{\max}}{K_M} \right) [S] \quad (12)$$

Pri ovim uvjetima reakcija će biti prvog reda i teći će brzinom koja je izravno razmjerna koncentraciji supstrata.

Pri velikim koncentracijama supstrata, kada su one puno veće od  $K_M$ ,  $v_0$  će tada biti:<sup>1</sup>

$$V_0 = V_{max} \quad (13)$$



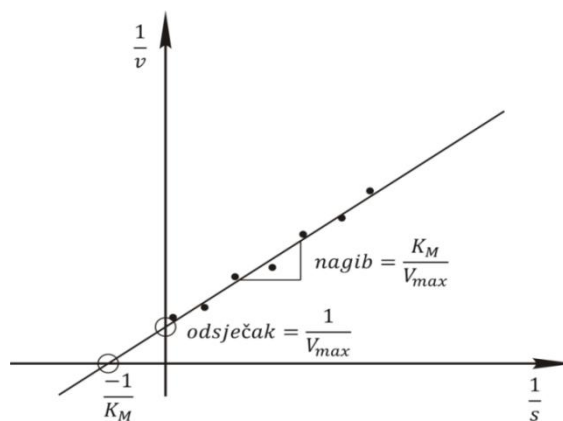
**Slika 4.** Kinetika tipa Michaelis-Menten

#### 1.3.1.1. Linearizacije Michaelis-Menten jednadžbe

Svrha kinetičkih mjerenja su određivanje vrijednosti  $K_M$  i  $V_{max}$ .

- **Lineweaver-Burk prikaz:** Ovaj prikaz predstavlja recipročni oblik Michaelis-Menten jednadžbe te glasi:

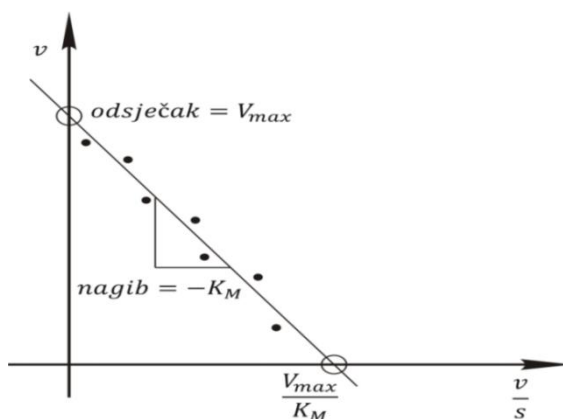
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (10)$$



**Slika 5.** Lineweaver-Burk prikaz

- **Eadie-Hofstee prikaz:** Eadie-Hofstee jednadžba izvedena je množenjem Lineweaver-Burk jednadžbe s  $v_0 \cdot V_{max}$  te glasi:

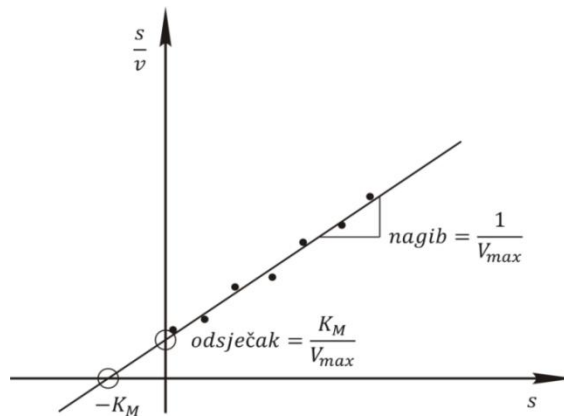
$$v_0 = V_{max} - K_M \cdot \frac{v_0}{S} \quad (11)$$



**Slika 6.** Eadie-Hofstee prikaz

- **Hanes-Wolf prikaz:** Množenjem Lineweaver-Burk jednadžbe sa  $[S]$ , dobijemo Hanes-Woolf jednadžbu:

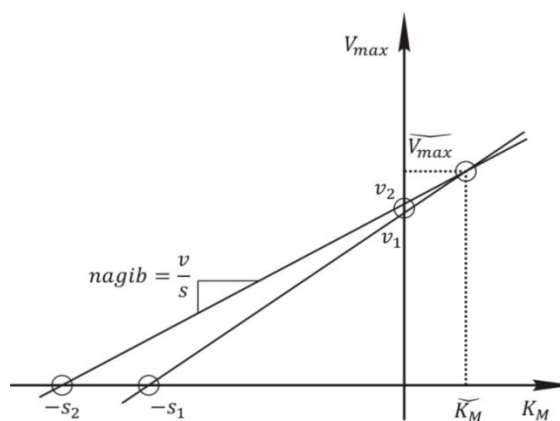
$$\frac{S}{v_0} = \frac{K_M}{V_{max}} + \frac{S}{V_{max}} \quad (12)$$



**Slika 7.** Hanes-Wolf prikaz

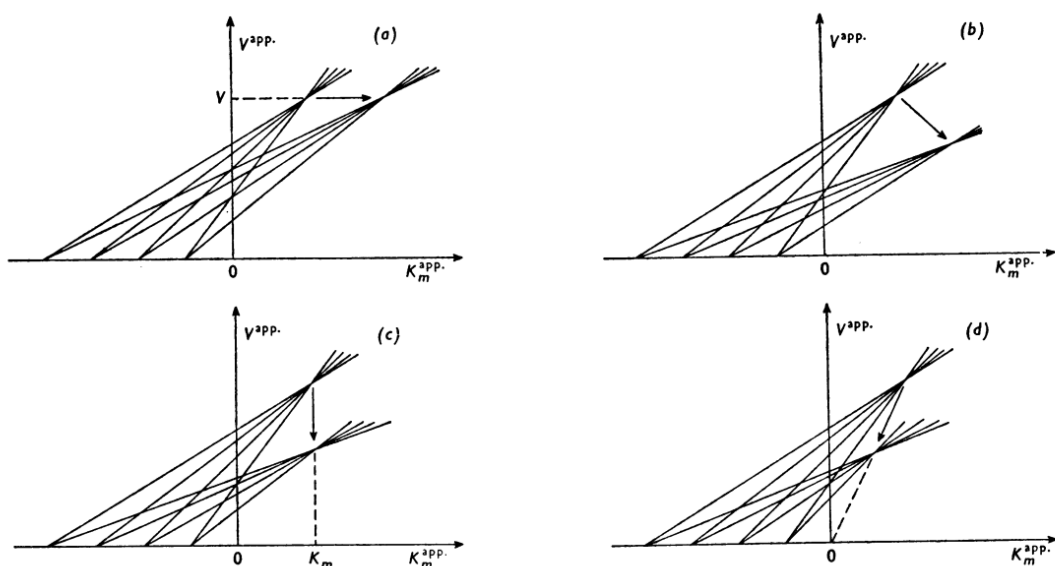
- **Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz:** Vrlo koristan grafički način određivanja  $K_M$  i  $V_{max}$ . Za svako mjerenje nanosi se vrijednost  $-[S]$  na os  $K_{max}$  i vrijednost  $v$  na os  $V_{max}$ . Povuč se pravac kroz svakih par točaka.  $K_M$  i  $V_{max}$  su koordinate sjecišta pravaca.

$$V_{max} = v_0 + \frac{v_0}{S} * K_M \quad (13)$$



**Slika 8.** Eisenthal – Cornish-Bowden prikaz

Vrsta inhibicije se može odrediti pomoću Eisenthal – Cornish-Bowden prikaza na način da se za različite koncentracije inhibitora određuje skup sjecišta (sa koordinatama  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ) te se ovisno načinu "kretanja" tih sjecišta (porastom koncentracije inhibitora) određuje vrsta inhibicije. Kada su točke sjecišta paralelne s  $K_M$  osi radi se o kompetitivnoj inhibiciji (slika 9a), a ako su točke sjecišta paralelne s  $V_{max}$  osi radi se o nekompetitivnoj inhibiciji (slika 9c). Slučaj c i d (slika 9) prikazuju smjer "kretanja" točaka sjecišta za miješanu i akompetitivnu inhibiciju.



**Slika 9.** Određivanje vrste inhibicije: a) kompetitivna, b) miješana, c) nekompetitivna i d) akompetitivna. Za svaku vrstu inhibicije, strelica pokazuje smjer kretanja zajedničkog sjecišta ( $K_M^{app}$ ,  $V_{max}^{app}$ ) na grafu, koje se pomiče kako koncentracija inhibitora raste.<sup>6</sup>



## 1.4. Inhibicija enzimске aktivnosti

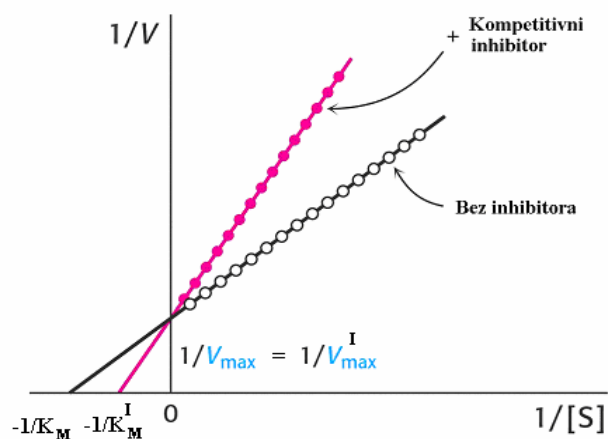
Inhibitor (lat. *inhibire*: zadržati, priječiti) u biokemiji je tvar koja usporava ili u potpunosti zaustavlja enzimski kataliziranu kemijsku reakciju. Inhibitori enzimске reakcije mogu biti ireverzibilni i reverzibilni. Karakteristično za ireverzibilnu inhibiciju jest potpuni gubitak enzimске aktivnosti nakon nekog vremena, osim ako je inhibitor bio prisutan u manjoj koncentraciji nego enzim. Enzimska aktivnost koja je inhibirana ireverzibilnim inhibitorom se ne može povratiti nikakvom fizikalnom metodom, ali ju je moguće povratiti određenim kemijskim metodama. Ako je inhibitor reverzibilan, povrat enzimске aktivnosti može se ostvariti uklanjanjem inhibitora bilo kemijskim bilo fizikalnim putem.<sup>7</sup>

Razlikujemo tri vrste reverzibilnih inhibitora koji se mogu međusobno razlučiti na temelju kinetičkih parametara:<sup>1</sup>

- **Kompetitivni inhibitor** smanjuje brzinu katalize na taj način da smanjuje broj enzima koje vežu supstrat. On često nalikuje na supstrat i veže se na aktivno mjesto enzima. Kod konkurentne ili kompetitivne inhibicije, enzim može vezati ili supstrat (tvoreći kompleks ES) ili inhibitor (EI), ali nikad oba (ESI). Glavna značajka kompetitivne inhibicije je da se ona može nadvladati velikom koncentracijom supstrata. Kompetitivni inhibitor prividno povećava  $K_M$  (Slika 10). Prividno vrijednost  $K_M$ , zvana  $K_M^{app}$ , brojčano je jednaka:

$$K_M^{app} = K_M(1 + [I]/K_I) \quad (14)$$

gdje je  $[I]$  koncentracija inhibitora, a  $K_I$  konstanta disocijacije kompleksa enzim-inhibitor.



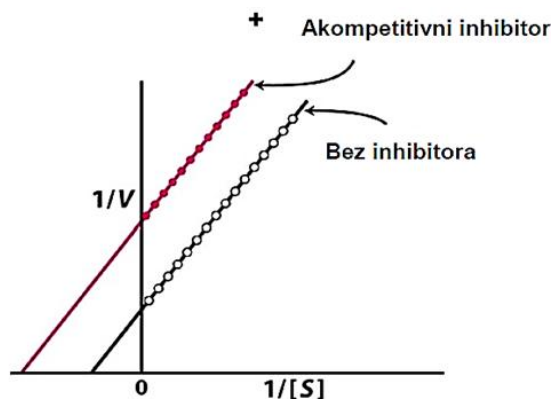
**Slika 10.** Lineweaver-Burk prikaz kompetitivne inhibicije

- **Akompetitivni inhibitor** se ne veže na slobodni enzim, nego samo na ES kompleks . Vezno mjesto za akompetitivni inhibitor se formira tek nakon interakcije enzima i supstrata. On smanjuje prividnu vrijednost  $K_M$  (Slika 11). Vezno Prividni  $K_M$  i  $V_{max}$  iznose:

$$K'_M = K_M^{app} = \frac{K_M}{\alpha'} = \frac{K_M}{1 + \frac{[I]}{K'_I}} \quad (15)$$

$$V'_{max} = V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\alpha'} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K'_I}} \quad (16)$$

gdje je  $K'_I$  je konstanta nastajanja kompleksa ESI, a  $\alpha'$  faktor za koji se smanjuju  $K_M$  i  $V_{max}$ .

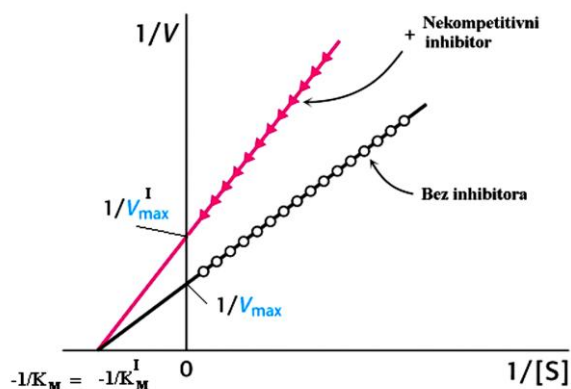


**Slika 12.** Lineweaver-Burk prikaz akompetitivne inhibicije

- **Nekompetitivni inhibitor** djeluje tako da smanjuje obrtni broj enzima (to je broj molekula supstrata koji molekula enzima pretvori u produkt u jedinici vremena, kada je enzim potpuno zasićen supstratom), ali pri tome ne smanjuje broj molekula enzima koje mogu vezati supstrat. Pri nekompetitivnoj inhibiciji, inhibitor i supstrat se mogu istodobno vezati na različita mjesta. Vrijednost  $V_{max}$  se smanjuje,  $V_{max}^{app}$ , a  $K_M$  ostaje nepromijenjen (Slika 13). Prividni  $V_{max}$  iznosi:

$$V'_{max} = V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\alpha} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}}, \quad (17)$$

gdje je  $\alpha$  faktor za koji se smanjuje  $V_{max}$ , a  $K_I$  konstanta nastajanja kompleksa EI.



**Slika 14.** Lineweaver-Burk prikaz nekompetitivne inhibicije

- **Miješani inhibitor** - u ovoj vrsti inhibicije inhibitor se može vezati ili na sam enzim, pri čemu zauzme aktivni mjesto (kompetitivna inhibicija) i tada se supstrat ne može vezati jer je aktivno mjesto već zauzeto, ili na već postojeći enzim-supstrat kompleks, ali ne zauzimajući aktivno mjesto namijenjeno pravom supstratu (osobina nekompetitivne inhibicije).  $K_M$  se povećava, a  $V_{max}$  smanjuje (Slika 15). Prividni  $V_{max}$  i  $K_M$  iznose:

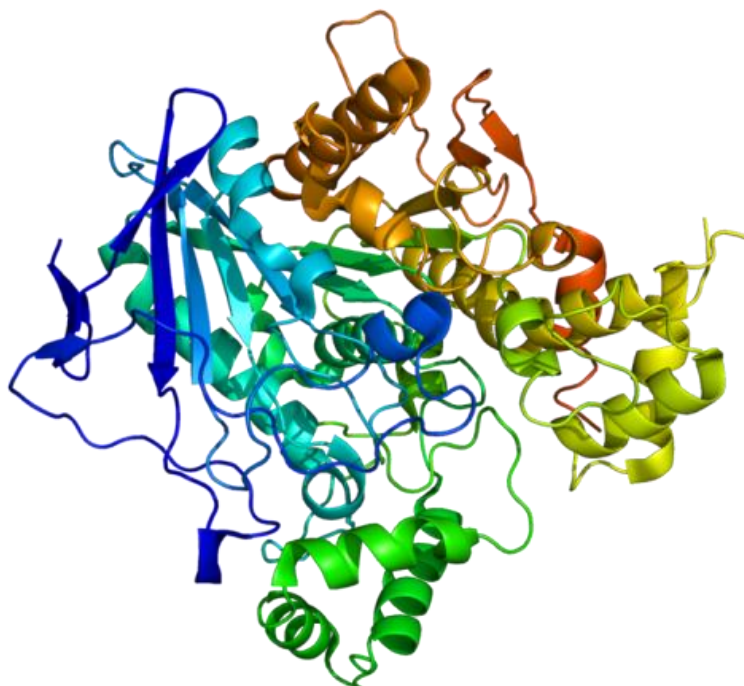
$$V'_{max} = V_{max}^{app} = \frac{V_{max}}{\alpha'} = \frac{V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K'_I}} \quad (24)$$

$$K'_M = K_M^{app} = \frac{\alpha K_M}{\alpha'} = \frac{\left(1 + \frac{[I]}{K'_I}\right) K_M}{1 + \frac{[I]}{K'_I}} \quad , \quad (25)$$

gdje je  $\alpha$  faktor za koji se smanjuje  $V_{max}$ ,  $K_I$  konstanta nastajanja kompleksa EI,  $K'_I$  je konstanta nastajanja kompleksa ESI, a  $\alpha'$  faktor za koji se smanjuju  $K_M$  i  $V_{max}$ .

## 1.5. Butirilkolinesteraza

Butirilkolinesteraza (BuChE) je enzim koji se sintetizira u jetri i nakon toga se izlučuje u krv. Pripada skupini kolinesteraza odnosno esteraza. Esteraze spadaju u grupu hidrolaza. One cijepaju estere na kiseline i alkohol kemijskom reakcijom koju nazivamo hidroliza. Postoji širok raspon različitih esteraza koje se razlikuju po svojem specifičnom supstratu, proteinskoj strukturi te njihovoj biološkoj funkciji. Osim u plazmi i u jetri aktivnost enzima dokazana je i u drugim tkivima, poput masnog tkiva, tankog crijeva, pluća i bijele tvari mozga.<sup>8</sup>



**Slika 15.** Struktura butirilkolinesteraze (PDB: 1P0I)<sup>9</sup>

### **1.5.1. Fiziološka i farmakološka uloga**

Njena fiziološka uloga nije poznata. Pretpostavlja se da sudjeluje u metabolizmu lipida i lipoproteina te u hidrolizi butirilkolina, intermedijernog metabolita koji nastaje tijekom metabolizma ne-esterificiranih masnih kiselina u jetri. Isti enzim sudjeluje i u prijenosu spore živčane provodljivosti, dok u sinapsama u središnjem živčanom sustavu razgrađuje acetilkolin.<sup>10</sup> Acetilkolin (ACh) je neuroprijenosnik neuromišićne sinapse i preganglijskih simpatičkih te preganglijskih i postganglijskih parasimpatičkih aksona. To je jedini klasični neuroprijenosnik što nije aminokiselina ili izravno sintetiziran iz aminokiseline. U perifernom živčanom sustavu acetilkolin izaziva kontrakciju mišića, suženje zjenice, pojačavanje peristaltike crijeva, usporavanje rada srca, proširenje krvnih žila, pojačano lučenje žlijezda znojnice, slinovnica te želučanih i bronhalnih žlijezda. U središnjem živčanom sustavu acetilkolin ima važnu ulogu u održavanju stanja svijesti i procesima učenja i pamćenja.<sup>11</sup>

### **1.5.2. Butirilkolinesteraza i patološka stanja**

Pored svoje uloge u metabolizmu lipida, promjene butirilkolinesteraze (BuChE) uočene su u bolesnika koji imaju različite neoplazme, poput karcinoma pluća i novotvorine stanica hematopoetskog sustava. Aktivnost BuChE smanjena je kod bolesnika s malignim tumorima želuca, debelog crijeva i prostate.

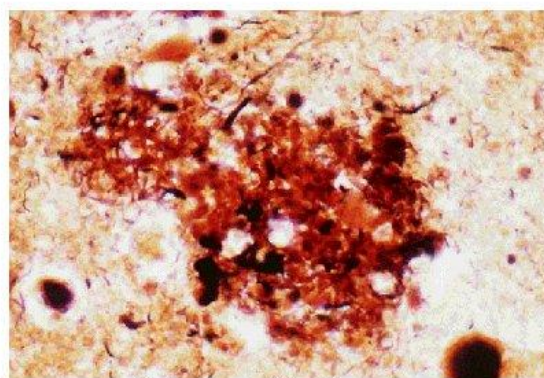
Danas je poznato da su BuChE i acetilkolinesteraza (AChE) povezane s patogeneom i progresijom Alzheimerove bolesti. BuChE i AChE su ciljno mjesto djelovanja lijekova koji inhibiraju njihovu katalitičku aktivnost i stoga se koriste za liječenje Alzheimerove bolesti.<sup>12</sup>

### **1.5.3. Alzheimerova bolest**

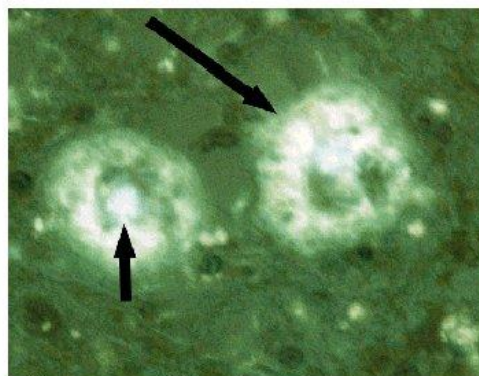
Alzheimerova bolest je progresivna i degenerativna bolest središnjeg živčanog sustava koja se klinički očituje kao propadanje intelektualnih (kognitivnih) sposobnosti uz promjenu ponašanja i ličnosti, u tolikoj mjeri da ometa svakodnevne aktivnosti bolesnika i značajno smanjuje kvalitetu njegovog života. Od ove bolesti uglavnom obolijevaju ljudi starije životne dobi, a moguća su oboljenja i kod mlađih osoba. Bolest je dobila ime po njemačkom neurologu Aloisu Alzheimeru koji je 1906. godine prvi opisao 51-godišnju bolesnicu sa simptomima paranoidnih ideja, gubitka pamćenja i poremećaja govora. Pojavljivanje Alzheimerove bolesti je podjednako među spolovima, dok je prevalencija značajno viša u žena, što je vjerojatno posljedica nešto duljeg životnog vijeka kod žena. Mogući čimbenici koji povećavaju rizik od nastanka Alzheimerove bolesti su traume glave, bolesti štitnjače, depresivna stanja, niži stupanj edukacije, iako njihova uloga nije jednoznačno potvrđena. Nasuprot tome smatra se da dugotrajna terapija ne-steroidnim protuupalnim lijekovima i statinima smanjuje rizik od nastanka Alzheimerove bolesti.

Posljednjih godina intenzivna su istraživanja vezana uz biokemijske promjene u tkivu središnjeg živčanog sustava osoba oboljelih od Alzheimerove bolesti. Djelovanje BuChE progresivno se povećava s vremenom kod pacijenata s Alzheimerovom bolesti (AD), a aktivnost acetilkolinesteraze (AChE) ostaje nepromijenjena ili se smanjuje. Kao i AChE, BuChE inaktivira neuroprijenosnik acetilkolin (ACh) i kao takva postala je terapijski cilj u Alzheimerovoj bolesti. Selektivna, reverzibilna inhibicija BuChE u mozgu može predstavljati način ublažavanja simptoma Alzheimerove bolesti, poboljšanje kognitivnih funkcija i moduliranje neuropatoloških markera bolesti.<sup>13</sup>

Jedna od najvažnijih promjena na mozgu kod oboljelih od Alzheimerove bolesti je stvaranje senilnih ili neuritskih ploča (plakova). One nastaju izvan neurona, a u njima se nakuplja poseban protein tzv.  $\beta$ -amiloid. Te su ploče veličine oko 0,2 mikrometra, a sastoje se od centra i rubnog dijela (Slika 16).<sup>14</sup>



Bojano hematoksilinom i  
eozinom

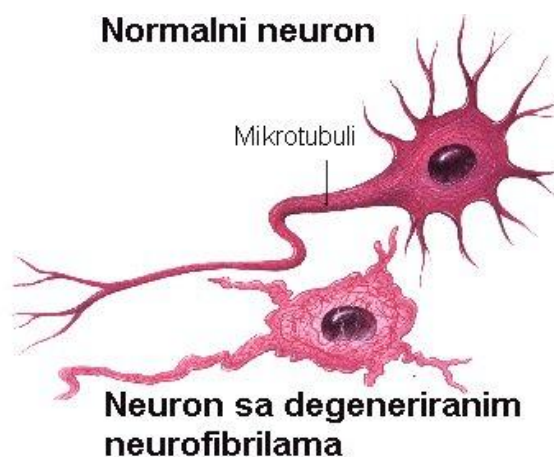


Fluorescencijski mikroskop (strelicom  
su oznaceni centralni dijelovi senilnih ploča)

**Slika 16.** Senilne ploče (plakovi)<sup>15</sup>

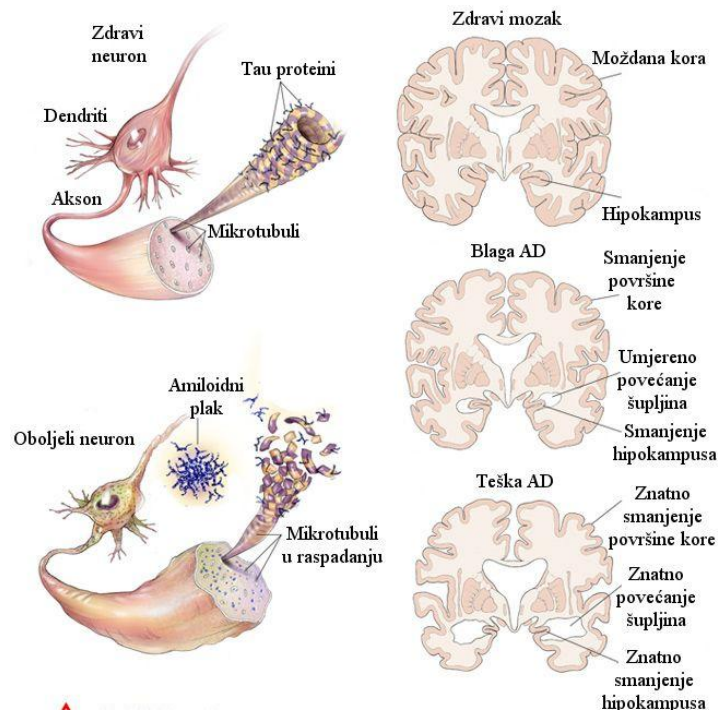
Senilne se ploče obično nalaze u blizini kapilara ili većih krvnih žila koje su koncentrirale  $\beta$ -amiloid u stjenkama. Osim  $\beta$ -amiloida, u senilnim se pločama mogu naći i brojni drugi proteini: trombin i tkivni aktivator plazminogen, inhibitori proteaza, enzimi i proteini koji su važni u imunom sustavu (primjerice kompleменти). Senilne se ploče uglavnom mogu naći u kori velikog mozga, ali ima ih i u još nekim dijelovima mozga. Druga važna dijagnostička značajka Alzheimerove bolesti je degeneracija neurofibrila koja se odvija unutar stanica tj. unutar neurona.<sup>14</sup>





**Slika 17.** Usporedni prikaz normalnog neurona i neurona s degeneriranim neurofibrilima<sup>16</sup>

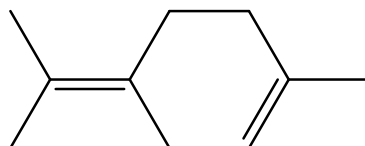
Kod uznapređovalog stadija Alzheimerove bolesti mozak je pacijenata difuzno atrofičan, dok je ukupna težina mozga smanjena za 20 i više posto. Gledano svjetlosnim mikroskopom uočavaju se široka područja bez živčanih stanica (više od 40% stanica većih od 90 nanometara zauvijek propada), dok su preostale stanice smanjena volumena sa smanjenim dendritima i gubitkom sinapsa. Alzheimerova bolest je obilježena poremećajem unutar svih znanih AChE sustava. Čini se da su kognitivne promjene uzrokovane ponajprije degeneracijom kolinergičnih neurona u kori velikog mozga i hipokampusa, što dovodi do smanjenja kolinergičnog prijenosa.<sup>14</sup>



**Slika 18.** Usporedni prikaz razlika mozga zdrave osobe i osobe oboljele od Alzheimerove bolesti<sup>17</sup>

## 1.6. $\alpha$ -Terpinolen

$\alpha$ -Terpinolen je bezbojna do jantarno obojena tekućina ili ulje koje se koristi kao otapalo za smole i eterična ulja, te u proizvodnji sintetskih smola i sintetskih aroma. Karakterizira ga slatkasti miris koji podsjeća na bor i okus limuna, netopljiv je u vodi i ima manju gustoću od nje. Neka od kemijskih imena koja se koriste kao sinonimi za  $\alpha$  terpinolen su: terpinolen, izoterpinen i dr.<sup>18</sup>  $\alpha$ -Terpinolen se može naći u tragovima u vinovoj lozi (lat. *Vitis vinifera*), peršinu i u nekim drugim biljkama.  $\alpha$ -Terpinolen pripada prirodnoj skupini metadiena, odnosno grupe terpena koji na para (*p*) položaju imaju metilnu skupinu i dvije dvostruke veze.<sup>19</sup>



Slika 19.  $\alpha$ -Terpinolen<sup>20</sup>

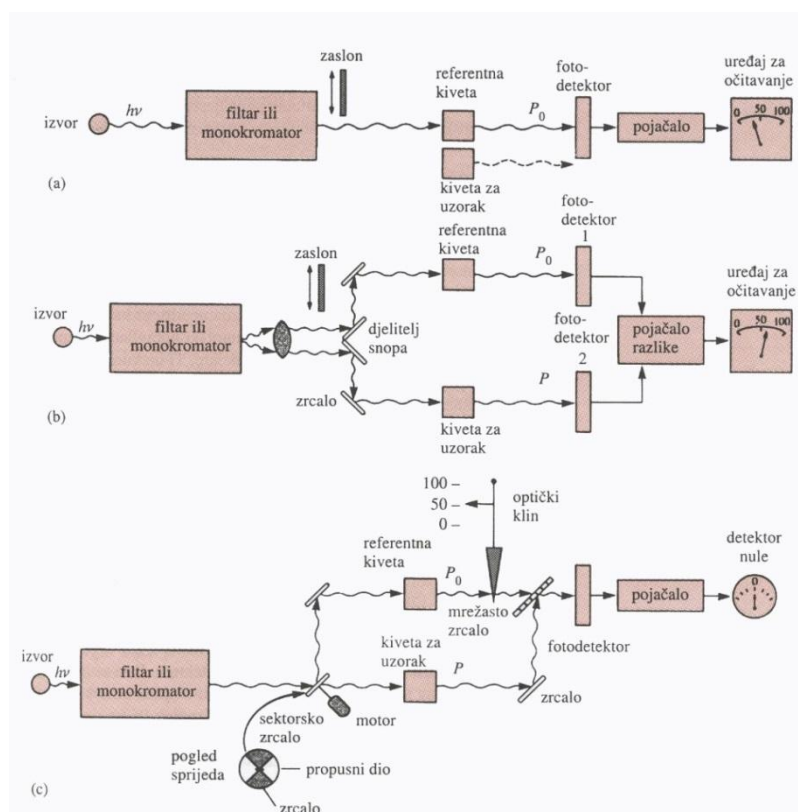
**Tablica 2.** Fizikalne osobine terpinolena<sup>18</sup>

<b>Vrelište</b>	187 °C
<b>Topljivost</b>	U vodi, 9.5 mg / L na 25 ° C
<b>Gustoća</b>	0,8632 g / cm <sup>3</sup> na 15 ° C
<b>Tlak pare</b>	0,74 mm Hg na 25 ° C

## 1.7. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je način određivanja koncentracije materijala u uzorku mjerenjem količine svjetla koju je uzorak apsorbirao.<sup>21</sup> Spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. Spektrofotometar je spektrometar koji se sastoji od izvora zračenja, monokromatora i detektora. Monokromator je tako izveden da je moguće mijenjati valnu duljinu zračenja koje propušta. Bilježenjem intenziteta zračenja koje je uzorak apsorbirao, propustio ili reflektirao ovisno o valnoj duljini nastaje spektar.<sup>25</sup> Razlikuju se četiri osnovna spektroskopska instrumenta:<sup>22</sup>

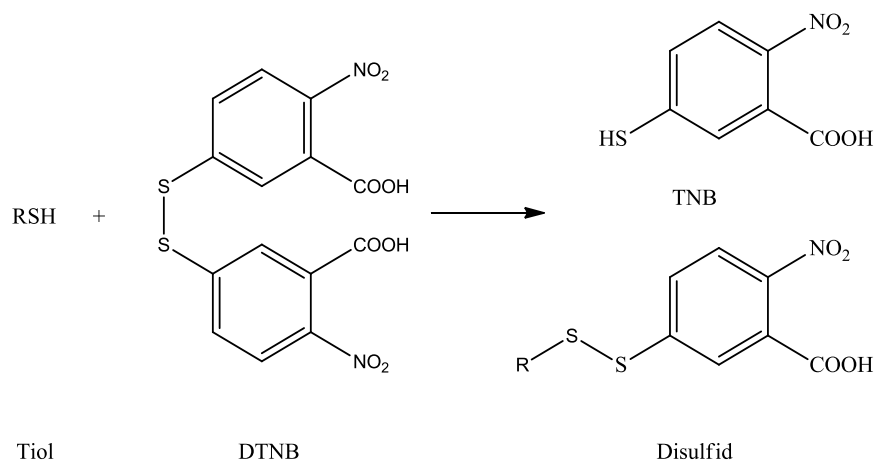
- jednosnopni,
- dvosnopni – prostorno odijeljenih snopova,
- dvosnopni – vremenski odijeljenih snopova, i
- višekanalni instrumenti.



**Slika 21.** Prikaz spektrofotometra: (a) jednosnopni instrument;  
(b) dvosnopni instrument s prostorno razdvojenim snopovima;  
(c) dvosnopni instrument s vremenski razdvojenim snopovima<sup>22</sup>

### 1.7.1. Ellmanova metoda

Ellmanova metoda je spektrofotometrijska metoda koja služi za mjerenje aktivnosti kolinesteraza pri čemu rabi tiokolinske supstrate. Ellmanov reagens (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina ili DTNB) se koristi za određivanje broja ili koncentracije tiolnih skupina u uzorku. Tioli reagiraju s DTNB-om i tom reakcijom nastaje 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB), koja zatim u vodi ionizira u  $\text{TNB}^-$  anion kod neutralnog ili alkalnog pH. Oslobođeni  $\text{TNB}^-$  ion ima intenzivno žutu boju. Apsorpcijski maksimum DTNB-a je pri valnoj duljini od 320 nm, dok se količina oslobođenog  $\text{TNB}^-$  mjeri pri duljini od 412 nm.<sup>23</sup>



**Slika 22.** Ellmanova reakcija za određivanje tiola

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

Kao izvor enzima korištena je butirilkolinesteraza (BuChE) iz seruma konja, a kao supstrat enzima korišten je butiriltiokolin jodid (BuTChI). Kao inhibitor enzima korišten je  $\alpha$ -terpinolen. Za ispitivanje sposobnosti inhibicije BuChE korištena je modificirana spektrofotometrijska metoda po Ellmanu koristeći DTNB kao tiolni reagens.

### 2.1. Priprema kemikalija

Da bi se izvršila sva mjerenja pripremljene su sljedeće otopine:

- enzim BuChE otopljen u puferu pH=8, koncentracije 0,03 U/mL
- otopine supstrata (BuTChI) koncentracija u sustavu: 0,1 mM; 0,2 mM; 0,3 mM; 0,4 mM i 0,5mM
- DTNB otopljen u puferu pH=7 + 0,12 mM NaHCO<sub>3</sub>
- otopine uzorka (inhibitora)  $\alpha$ -terpinolen u etanolu, koncentracija u sustavu: 0,0568  $\mu$ g m/L; 0,0114  $\mu$ g m/L; 0,0023mg m/L

**Tablica 3.** Priprema kemikalija za rad

Kemikalija	Volumen / $\mu$ L	Koncentracija u sustavu
<b>Pufer</b>	180	
<b>DTNB</b>	10	0,3mM
<b>BuTChI</b>	10	0,5mM
<b>BuChE</b>	10	0,03 U/mL

### 2.1.1. Određivanje kinetičkih parametara i sposobnosti inhibicije BuChE

**Tablica 4.** Shema otopina u eksperimentu

<b>H<sub>2</sub>O</b>	Kontrola	BL <sub>1</sub>	BL <sub>2</sub>	Uzorak M	Uzorak BL
<b>Pufer</b>	190	200	200	180	190
<b>DTNB</b>	10	10	10	10	10
<b>Uzorak</b>	/	/	/	10	10
<b>BuChE</b>	10	/	10	10	/
<b>BuTChI</b>	10	10	/	10	10

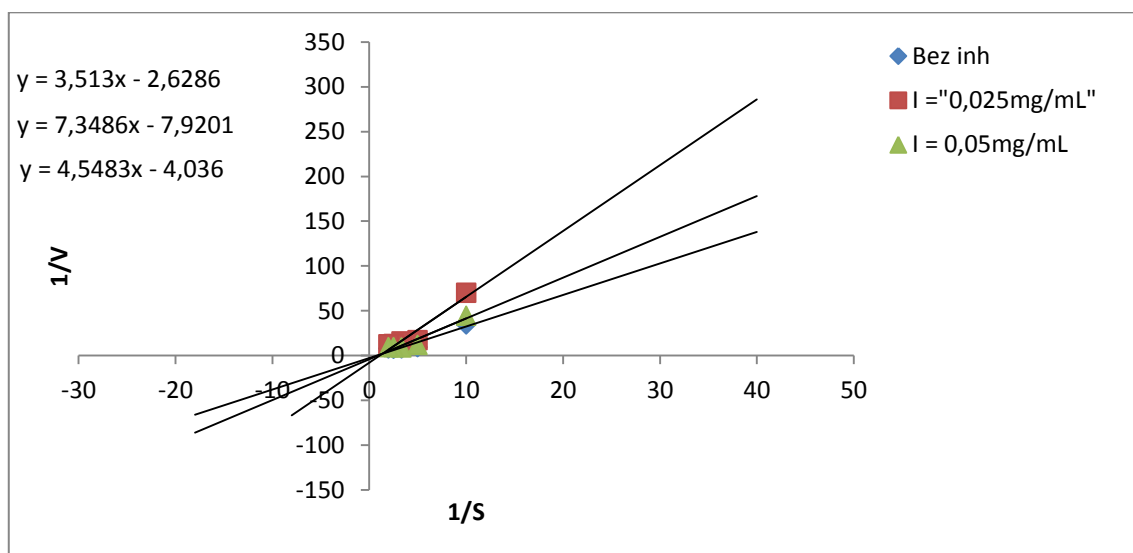
Uzorci se "otpipetiraju" u jažice, prema shemi koja je prikazana u tablici 4. Supstrat, BuTChI, se dodaje neposredno prije mjerenja. Njegovim dodatkom počinje reakcija. Ne-enzimska hidroliza praćena je tzv. "blank" mjerenjima, odnosno slijepim probama. U jednoj slijepoj probi nije dodana BuChE, a u drugoj BuTChI koji se zamijeni jednakim volumenom pufera. Mjerenje se vršilo pomoću višekanalnog čitača mikrotitarskih pločica "Sunrise" (Tecan, GmbH, Austrija) uz automatsko miješanje i pohranjivanje podataka na računalo.

### 3. REZULTATI

U ovom radu je ispitana sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze uz inhibitor  $\alpha$ -terpinolen. Određeni su kinetički parametri  $K_M$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}$  i  $V_{max}^{app}$  i vrsta inhibicije.

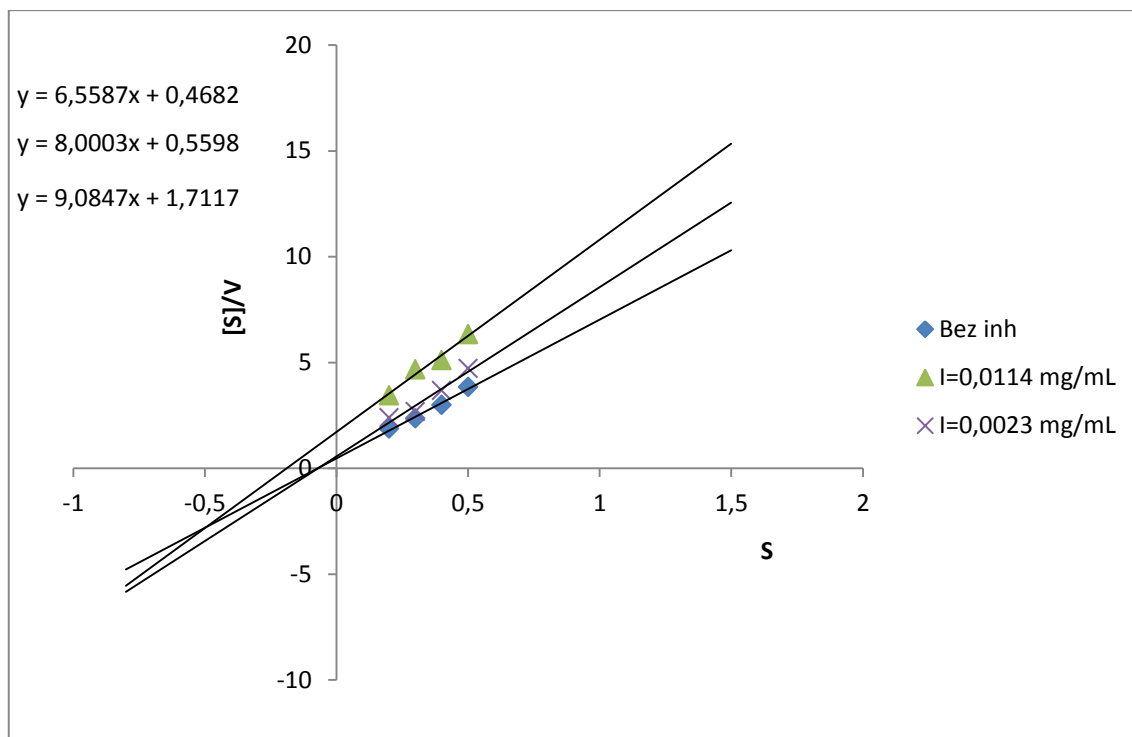
Načinjeni su različiti prikazi iz kojih su na temelju odgovarajućih sjecišta ili iz jednadžbe pravca, kako bi se što preciznije odredili kinetički parametri određene vrijednosti navedenih kinetičkih parametara. Korišteni prikazi su: Lineweaver-Burk, Hanes-Wolf i Eisenthal – Cornish-Bowden.

Dobiveni rezultati prikazani su slikama 23.-28., a određeni kinetički parametri sumarno su prikazani u tablici 5.



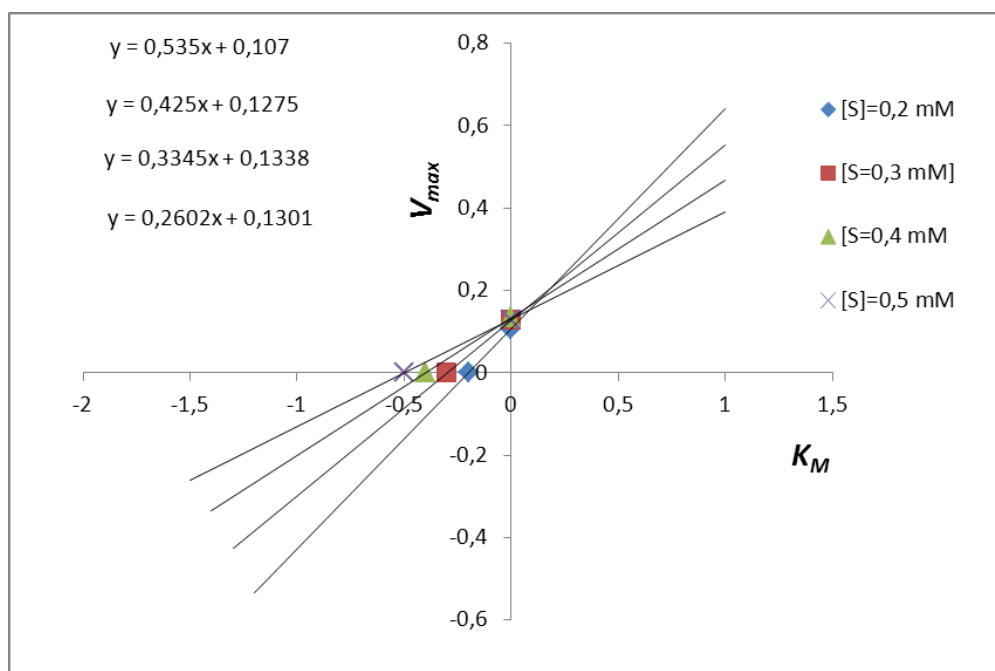
**Slika 23.** Lineweaver-Burk prikaz ovisnosti brzine hidrolize BuTChI o njegovoj koncentraciji



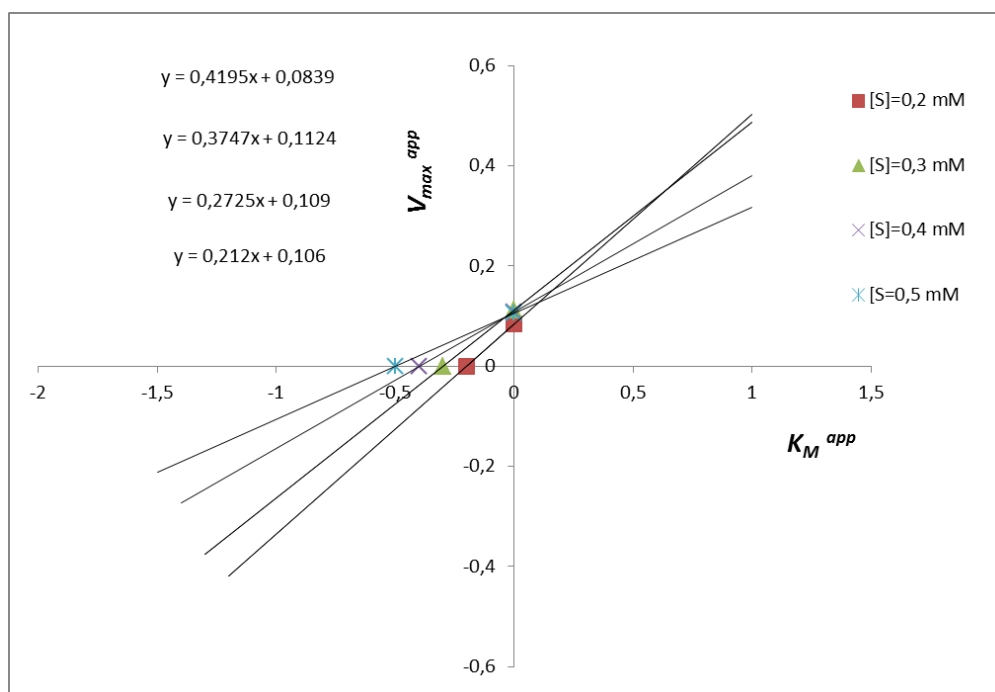


**Slika 24.** Hanes-Wolf prikaz ovisnosti brzine hidrolize BuTChI o njegovoj koncentraciji

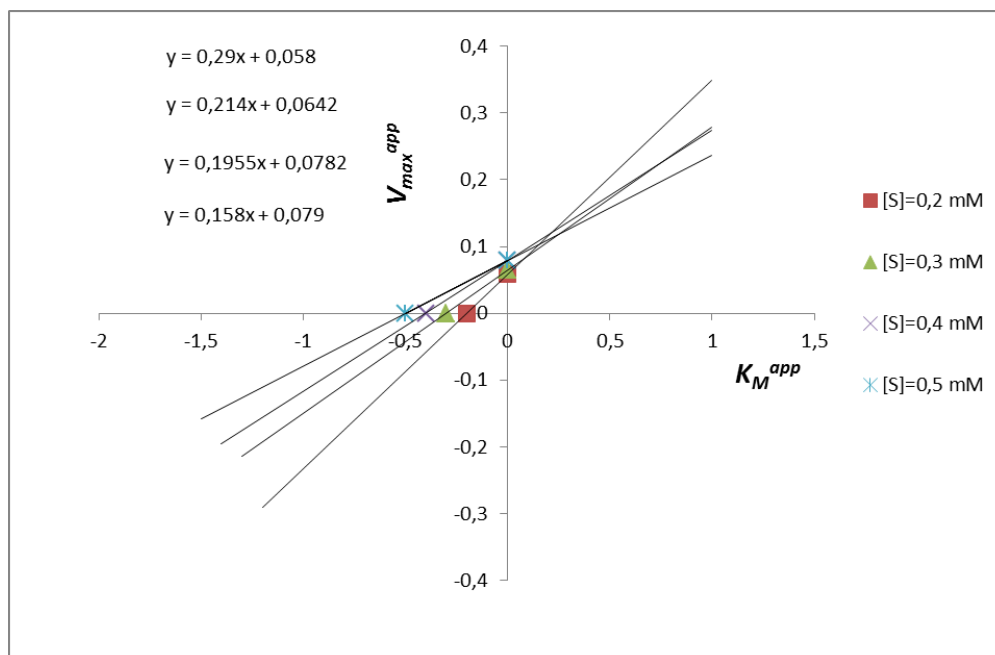
Eisenthal – Cornish-Bowden (ECB) prikaz je radi preglednosti konstruiran posebno za sve koncentracije inhibitora kao i bez inhibitora.



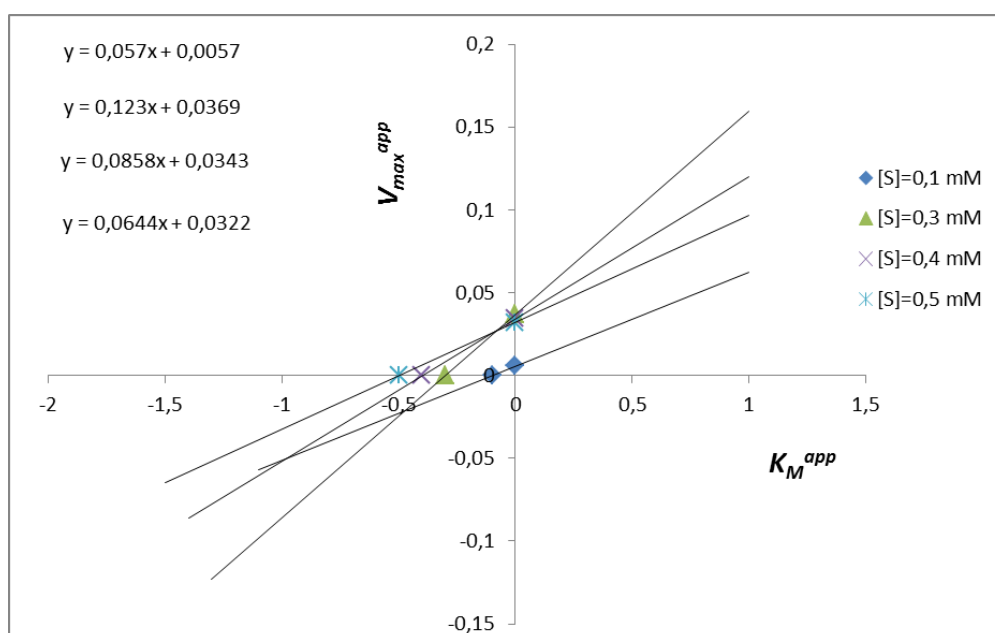
**Slika 25.** ECB prikaz bez inhibitora



**Slika 26.** ECB prikaz za koncentraciju inhibitora 0,0023 mg / mL



**Slika 27.** ECB prikaz za koncentraciju inhibitora 0,0114 mg / mL



**Slika 28.** ECB prikaz za koncentraciju inhibitora 0,0568 mg / mL

U tablici 5. su prikazane vrijednosti kinetičkih parametara određenih na temelju prethodnih grafova.

**Tablica 5.** Određeni kinetički parametri

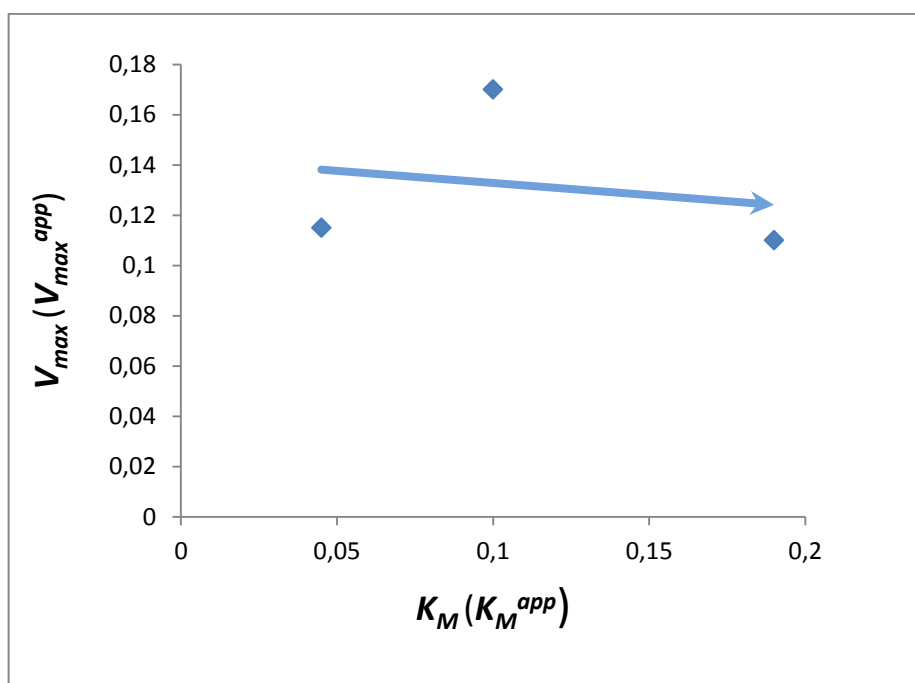
<b>LINEWEAVER-BURK</b>			
	<b>Bez inhibitora</b>	<b>[I]=0,0023 mg/mL</b>	<b>[I]=0,0114mg/mL</b>
$K_M$	0,195		
$K_M^{app}$		0,96	1,14
$V_{max}$	0,38		
$V_{max}^{app}$		0,13	0,25
<b>HANES-WOLF</b>			
	<b>Bez inhibitora</b>	<b>[I]=0,0023 mg/mL</b>	<b>[I]=0,0114mg/mL</b>
$K_M$	0,065		
$K_M^{app}$		0,8	0,62
$V_{max}$	0,192		
$V_{max}^{app}$		0,43	0,33
<b>EISENTHAL - CORNISH-BOWDEN</b>			
	<b>Bez inhibitora</b>	<b>[I]=0,0023mg/mL</b>	<b>[I]=0,0114mg/mL</b>
$K_M$	0,1		
$K_M^{app}$		0,045	0,19
$V_{max}$	0,17		
$V_{max}^{app}$		0,115	0,11

Na temelju prikaza Eissenthal - Cornish-Bowden određene su i konstante inhibicije  $K_I$  i  $K'_I$  za pojedinu koncentraciju inhibitora.

**Tablica 6.** Određene  $K_I$  i  $K'_I$  vrijednosti

[I]/mg / mL	$K_I$	$K'_I$
0,0023	/	0,005
0,0114	0,006	0,005

Iz prikaza Eissenthal – Cornish-Bowden određena je i vrsta inhibicije. Slika 30 priložena je kao dokaz na temelju kojega je zaključeno da se radi o inhibiciji miješanog tipa. Iz prikaza Eissenthal – Cornish-Bowden određeni su kinetički parametri  $K_M$ ,  $K_M^{app}$ ,  $V_{max}$  i  $V_{max}^{app}$  iz kojih je konstruiran graf prikazan na slici 30. Vrijednosti  $K_M$  odnosno  $K_M^{app}$  nanese su na apscisu, a  $V_{max}$  odnosno  $V_{max}^{app}$  na ordinatu kako bi se dobio smjer kretanja točaka sjecišta. Dobiveni smjer ukazuje za inhibiciju miješanog tipa (usporedba sa slikom 9b).



**Slika 29.** Smjer kretanja točaka sjecišta na ECB prikazu

Postotci inhibicije enzima BuTChI izračunati su prema sljedećoj formuli :

$$\% \text{ inhibicije BuTChI} = [ (A_K - A_A) / A_K ] \times 100, \quad (24)$$

$A_A$  je apsorbancija test otopine

$A_K$  je apsorbancija kontrolnog uzorka.

Rezultati inhibicijskog učinka različitih koncentracija  $\alpha$ -terpinolen pri koncentraciji supstrata BuTChI 0,5 mM prikazani su u tablici 7.

**Tablica 7.** Postotci inhibicije za različite koncentracije inhibitora

[I]/ mg mL <sup>-1</sup>	% inhibicije
0,0568	80,1
0,0114	42,6
0,0023	6,7

## 4. RASPRAVA

U ovom radu je ispitana sposobnost inhibicije enzima butirilkolinesteraze (BuChE) korištenjem  $\alpha$ -terpinolena kao inhibitora. Grafovi Lineweaver-Burk, Hanes-Wolf i Eisenthal – Cornish-Bowden prikazani su slikama 23-29. Na temelju ovih prikaza i postotaka inhibicije koji su izračunati (tablica 7.) može se vidjeti da je  $\alpha$ -terpinolen pokazuje sposobnost inhibicije enzima BuChE. Kako se povećava koncentracija  $\alpha$ -terpinolena tako se povećava i postotak inhibicije. Maksimalna inhibicija je postignuta pri koncentraciji od 0,0568 mg/mL i iznosi 80,1 %.

Iz prikaza Eisenthal – Cornish-Bowden može se zaključiti da je riječ o inhibiciji miješanog tipa. Kao dokaz priložena je slika 29. s odgovarajućim objašnjenjem. Iz jednadžbi pravaca izračunati su kinetički parametri  $K_M$  i  $V_{max}$  za reakciju hidrolize butiriltiokolin-jodida (BuTChI), enzimom BuChE te  $K_M^{app}$  i  $V_{max}^{app}$  za istu reakciju u funkciji različitih koncentracija inhibitora. Svi rezultati su sumarno prikazani u tablici 5.

Izračunate su i konstante inhibitora za miješani tip inhibicije i pri koncentraciji od 0,0114 mg/mL, a iznosile su:  $K_I=0,006$  te  $K_I'=0,005$ .

## 5. ZAKLJUČAK

- Ispitivanjem sposobnosti inhibicije enzima butirilkolinesteraze zaključeno je da  $\alpha$ -terpinolen pokazuje sposobnost inhibicije enzima.
- Povećanjem koncentracije  $\alpha$ -terpinolena povećava se postotak inhibicije, a najveća inhibicija je postignuta pri koncentraciji od 0,0568 mg/mL i iznosi 80,1 %,
- Na temelju prikaza Lineweaver-Burk, Hanes-Wolf i posebno Eisenthal – Cornish-Bowden vidljivo je da se radi o inhibiciji miješanog tipa.
- Konstante inhibitora za miješani tip inhibicije su  $K_I=0,005$  i  $K_I'=0,006$ .



## 6. LITERATURA

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 2013, p.8.
2. Krešimir Janeš, *Rast *Trametes versicolor* u uvjetima submerznog uzgoja*, Diplomski rad, Zagreb, 2009.
3. <http://documents.tips/documents/enzimaska-aktivnost.html> (12.08.2016)
4. Mladen Miloš, *Osnove biokemije*, Skripta za internu upotrebu, Split, 2009.
5. <http://www.irb.hr/users/batel/Organska%20kemija%20i%20biokemija/Biokemija%20II%20vje%C5%BEba.doc> (12.08.2016)
6. R. Eisenthal, A. Cornish-Bowden, *The Direct Linear Plot - A New Graphical Procedure For Estimating Enzyme Kinetic Parameters*, *Biochemistry Journal*, **139** (1973) 715-720
7. <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch09s04.html> (10.10.2016)
8. <https://en.wikipedia.org/wiki/Esterase> (10.10.2016.)
9. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1p0i> (10.10.2016)
10. Nina Blažević, *Učinci antilipidnih lijekova na butirilkolinesterazu u biološkom materijalu štakora*, Diplomski rad, Zagreb, 2014.
11. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Acetilolin> (10.10.2016)
12. Marija Macan, *Utjecaj antilipidnih lijekova na esterase, lipide i leptin u biološkom materijalu štakora*, Disertacija, Zagreb 2011.
13. D. Mahović, M. Boban, T. Babić, *Alzheimerova bolest: Suvremeni dijagnostički pristup temeljen na dokazima*, Liječnički vjesnik, 2005.
14. <http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori122.htm> (12.08.2016)
15. <http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/Slika3.jpg> (12.08.2016)
16. <http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/Slika4.jpg> (12.08.2016)
17. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Disertacija, Zagreb, 2014.
18. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/terpinolene#section=Top> (21.10.2016)
19. <https://de.wikipedia.org/wiki/Terpinolen> (21.10.2016)

20. <https://www.chemeo.com/cid/75-618-3/%C2%ABalpha%C2%BB-Terpinolene>  
(21.10.2016)
21. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometar> (21.10.2016)
22. <https://www.scribd.com/document/199581054/1-Spektrofotometrija>  
(12.08.2016)
23. G. L. Ellman, D. K. Courtney, V. Andres, R. M. Featherstone, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*, Biochem. Pharmacol; **7** (1961), 88-90